

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

EJU



REC'D 01 MAR 2000

WIPO

PCT

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

DE 99 / 210 99

**Bescheinigung**

Das Max- Delbrück- Centrum für Molekulare Medizin in Berlin/ Deutschland  
hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Gentransfervektor für die Diagnostik und die Therapie von  
malignen Tumoren"

am 29. Dezember 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.


Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole  
C 12 N und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 1. Februar 2000

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag



Aktenzeichen: 198 60 602.8

Wehner

## **Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin**

Dr. Wolff, Dr. Royer, C. Woischwill, Dr. Janz, Dr. Schumacher, Prof. Dörken

### **Gentransfervektor für die Diagnostik und die Therapie von malignen Tumoren**

#### **ZUSAMMENFASSUNG**

Die Erfindung betrifft einen Gentransfervektor für die Diagnostik und die Therapie von malignen Tumoren, der für ein beliebiges Transgen unter Kontrolle des tumorspezifischen YB-1 Promotors kodiert. Er besteht aus dem YB-1 Promotor, einem Transgen und zwei zum Herausschneiden des Transgens geeigneten "Multiple cloning sites" für Restriktionsenzyme, die das Transgen umgeben. In das Konstrukt kann ein beliebiges Gen hineinkloniert werden, um gewebsspezifisch in chemoresistenten Tumorzellen exprimiert zu werden.



## BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft einen neuen Gentransfervektor und seine Verwendung, insbesondere zur Behandlung von chemoresistenten Tumorzellen.

Bekanntermaßen sind etwa 50% aller Tumoren nicht behandelbar, da diese "multi-drug resistant" sind. So können z.B. Brustkrebszellen entweder primär resistent gegen Chemotherapie sein oder können diese Resistenz nach anfangs erfolgreicher Behandlung in einer späteren Phase entwickeln (sekundäre Therapieresistenz).

Ein solcher resistenter Phänotyp kann durch die Überexpression eines Transporterproteins zustande kommen. Dieses sogenannte *P-Glycoprotein* bildet als Transmembranprotein eine Art Pumpe für u.a. Chemotherapeutika, wodurch diese zurück in den extrazellulären Raum transportiert werden. Das *P-Glycoprotein* wird durch das MDR-1 ("Multi-drug-resistance") Gen kodiert, das auf transkriptioneller Ebene durch das YB-1 Bindungsprotein reguliert wird, indem dieses an der "Y-box" innerhalb der DNA Sequenz des MDR-1 Gens bindet (Van Veen and Konings et al, 1997, Sem Cancer Biol, 8, 183-191).

Der YB-1 Promotor kontrolliert die Expression des YB-1 Proteins, welches zur Familie der "Y-box" Bindungsproteine gehört. Diese Y-box Faktoren gehören einer hoch konservierten Klasse von Proteinen an, die in der Regulation von *Transkription* und *Translation* eine Rolle spielen. Die Proteine binden an eine Sequenz innerhalb der DNA eines Zielgens (die sogenannte Y-box Sequenz) wodurch es zur Expression dieses Gens kommt (Bargou et al, 1997, Nat Med, 3, 447-450).

YB-1 ist im Rahmen der Zellproliferation verstärkt exprimiert und kann durch genotoxische Substanzen, z.B. Chemotherapeutika, UV Licht und ionisierende Strahlen induziert werden (Koike et al, 1997, Febs Lett, 417, 390-394). Außerdem konnte festgestellt werden, daß die Expression von YB-1 in proliferierenden Zellen wie embryonalen und regenerierenden Geweben wesentlich erhöht ist, während dieser Zustand sich bei Gewebedifferenzierung umkehrt (Grant and Deeley, 1993, Mol Cell Biol, 12, 4186-4196, Spitkovsky et al, 1992, Nucleic Acids Res, 20, 797-803).

Eigene Studien konnten zeigen, daß die Überexpression des MDR-1 Gens in Brustkrebszellen und die damit zusammenhängende intrinsische Multidrug Resistenz mit der Aktivität und Lokalisation des YB-1 Proteins zusammenhängen (Bargou et al, 1997, Nat Med, 3, 447-450).

Bei vorhandener Chemoresistenz ist es also nötig, eine Alternative zum Gebrauch von Chemotherapeutika zu finden.

Bekanntermaßen wird Gentherapie für die Behandlung von erworbenen und vererbten Krankheiten eingesetzt, wobei es um den Transfer eines

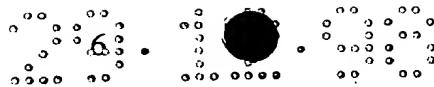
therapeutischen Gens, wie z.B. eines Tumorsuppressorgens, geht. Verschiedene Vektorsysteme stehen dabei zur Verfügung, um beim Gentransfer einen möglichst hohen Anteil der Zellen des Zielgewebes zu erreichen. Hierbei sind virale Vektoren bisher am geeignetsten. Adenovirale Vektoren werden zunehmend häufiger eingesetzt, da sie mit einer großen Effektivität eine Anzahl von Tumorgeweben infizieren können. Diese Vektoren enthalten eine jeweils spezifische Expressionskassette (EK), die durch die adenovirale Infektion in die Zielzelle gelangt. Diese Expressionskassette besteht aus einem Promotor und einem therapeutischem Gen, wobei der Promotor für die Expression des Gens in den Zielzellen sorgt. Häufig zum Einsatz kommende Promotoren sind z.B. SV40, RSV und CMV (Sandig et al, 1997, Nat med, 3, 313-319).

Die Tatsache, daß Adenoviren viele Gewebstypen infizieren können, ist einerseits ein Vorteil dieses Gentransfersystems. Gewöhnliche adenovirale Strategien sind andererseits bei gewissen Krankheiten/Therapien nicht ausreichend. Es ist also nötig, Verfahren zu entwickeln, bei denen die Genexpression nur auf bestimmte Zellen beschränkt wird. Dies kann durch *gewebsspezifische Promotoren* erreicht werden. Durch den Einsatz von z.B. tumorspezifischen Promotoren wird die Möglichkeit geschaffen, das therapeutische Gen nur im Tumorgewebe zu exprimieren und nicht in angrenzendem auch infizierten normalen Gewebe (Robbins et al, 1998, Trends Biotechnol, 16, 35-40). Hiermit erhöht sich die Zielgenauigkeit des Gentransfers, wodurch es möglich wird, auch solche therapeutischen Gene einzusetzen, die für die normalen Zellen schädlich sind.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, einen Vektor mit einer Expressionskassette zu entwickeln, die einen tumorspezifischen Promotor enthält, der zielgerichtet nur in chemoresistenten Tumorzellen ein relevantes Gen exprimiert. Dieser Genthervektor soll also in Tumorzellen zum Einsatz kommen, die schon chemoresistent und damit auf eine konventionelle Chemotherapie nicht mehr ansprechen.

Die Kassette soll zum einen so konstruiert sein, daß sie in verschiedene Gentransfervektoren, wie z.B. in adenovirale Vektoren, hineinkloniert werden kann. Zum anderen soll es gleichzeitig möglich sein, die verschiedensten therapeutischen Gene ohne großen technischen Aufwand "downstream" vom Promotor in diese Kassette hineinzuklonieren.

Die Aufgabe wird gemäß den Patentansprüchen durch einen Vektor gelöst, der die folgenden Bestandteile hat: den YB-1 Promotor, ein Transgen und zwei "Multiple cloning sites" (MCS). Hierbei soll der tumorspezifische YB-1 Promotor in chemoresistenten Tumorzellen durch adenoviralen Gentransfer ein Transgen zur Expression bringen. Dieses Transgen kann ein therapeutisch relevantes, wie z.B. ein Apoptose-induzierendes Gen sein, wodurch ein



Absterben der Tumorzellen eingeleitet wird. Es kann auch ein "Prodrug converting enzyme" sein, das ein bestimmtes von außen zugefügtes Molekül ("prodrug") in einen pharmakologisch aktiven Stoff umwandelt, der dann seine therapeutische Wirkung auf die Tumorzellen auswirkt. Weiterhin können auch zwei verschiedene therapeutisch relevante Gene in einem sogenannten Doppelgentransfer unter die Kontrolle des YB-1 Promotors gestellt werden.

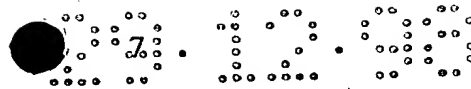
Der YB-1 Promotor ist dabei in eine dementsprechend angepasste MCS eines Vektors kloniert. Diese ist dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Anzahl ausgewählter Restriktionsenzym-Schnittstellen (RES) enthält, die es zulassen, ein neues therapeutisches Gen "downstream" des Promotors in die Expressionskassette zu klonieren, ohne daß am restlichen Vektor bzw. am sich schon im Vektor befindlichen YB-1 Promotor Veränderungen vorgenommen werden müssen.

Der neue Gentransfervektor ist zur Behandlung von Tumoren einsetzbar. Bevorzugt eignet er sich zur Behandlung von chemoresistenten Tumoren. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit besteht in der Diagnostik (Mikrolokalisierung von Tumoren).

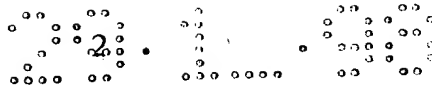
#### AUSFÜHRUNGSBEISPIEL

Zunächst wird das entsprechende therapeutische Gen hinter den YB-1 Promotor (Nukleotid 259-294 der MCS des pCR2.1 Vektors von Invitrogen und Nukleotid 453-2150 der YB-1 Promotor-Sequenz, Genbank Acc.# X96666) kloniert. Diese beiden Elemente stellen die Expressionskassette dar (siehe Abb. 1). Hierbei wird der YB-1 Promotor so in eine speziell für diese Zwecke angepasste MCS eines Vektors kloniert, daß verschiedene therapeutische Gene unter die Kontrolle des Promotors gesetzt werden können, ohne daß die MCS erneut angepasst werden muß. Dabei handelt es sich um eine MCS, die eine Gruppe speziell ausgewählter RES enthält. Diese Schnittstellen sollen einen schnellen und unkomplizierten Austausch der therapeutischen Gene "downstream" vom Promotor in die Expressionskassette zulassen. Zusätzliche Veränderungen am restlichen Vektor bzw. am schon vorhandenen YB-1 Promotor werden hierdurch vermieden. Es entsteht somit eine Art "Baukastensystem", in dem die therapeutischen Gene unter geringem Aufwand auswechselbar sind (siehe Abb.2).

Die den YB-1 Promotor und das therapeutische Gen enthaltende Expressionskassette wird dann in ein sogenanntes Transferplasmid (TP) hineinkloniert. Dieses Plasmid enthält einen Teil des adenoviralen Genoms. Für diesen Schritt werden die RES der MCS genutzt, die die EK umgeben und die auch im Transferplasmid vorhanden sind. Das TP wird dann zusammen mit dem "Helferplasmid" (HP) in Bakterien (BJ Zellen) transformiert. Das Helferplasmid besitzt bis auf die E1- und E3-Region das gesamte adenovirale Genom, wobei die E1 Deletion den Virus replikationsdefizient macht. Da die adenoviralen

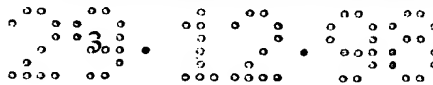


Genomabschnitte, die die EK im TP umgeben, eine Homologie mit bestimmten Abschnitten des Genoms des HP aufweisen, wird durch homologe Rekombination in den BJ Zellen ein rekombinantes adenovirales Plasmid generiert, das die Expressionskassette enthält (siehe Abb.3). Durch Gentransfertechniken, wie z.B. Calciumphosphat-Präzipitation oder Liposomen, wird dieses rekombinante adenovirale Plasmid dann in eine Produktionszelllinie (293; humane, embryonale Nierenzelllinie) eingebracht, um zur Produktion von replikationsdefizienten Viren zu führen. Diese enthalten das therapeutische Gen unter der Kontrolle des tumorspezifischen YB-1 Promotors. Danach werden in unterschiedlichen Mausstämmen (SCID und nude Mäuse) Tumore chemoresistenter Zelllinien (z.B. epithelialen Ursprungs) etabliert, die dann mit dem rekombinanten Virus infiziert werden. Die Messung der Transgenexpression durch z.B. ELISA- und immunhistochemische Techniken und seine Wirkung auf den Tumor werden dann in Hinsicht auf einen möglichen therapeutischen Ansatz analysiert.



## PATENTANSPRÜCHE

1. Gentransfervektor, bestehend aus
  - dem YB-1-Promoter, seinen Mutanten oder Deletionsvarianten,
  - einem Transgen oder der cDNA eines Transgens
  - zwei zum Herausschneiden des Transgens geeigneten Multicloningsites(MCS) für Restriktionsenzyme, die das Transgen umgeben.
2. Gentransfervektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Transgen ein therapeutisches Gen ist.
3. Gentransfervektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Transgen ein Reportergen ist.
4. Gentransfervektor nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das therapeutische Gen ein zellzyklusregulierendes oder ein proapoptotisches Gen ist.
5. Gentransfervektor nach Anspruch 1, 2 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß als therapeutisches Gen p16, p21, p53 oder Bax eingesetzt wird.
6. Gentransfervektor nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich ein regulierendes Element in den Vektor eingebracht wird.
7. Gentransfervektor nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Multicloningsites (MCS) für Restriktionsenzyme mindestens 3 Restriktionsenzymchnittstellen (RES) enthalten.
8. Gentransfervektor nach Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Multicloningsites (MCS) für Restriktionsenzyme 5-10 Restriktionsenzymchnittstellen (RES) enthalten.
9. Gentransfervektor nach Anspruch 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Multicloningsites (MCS) für Restriktionsenzyme keine Restriktionsenzymchnittstellen (RES) enthalten, die innerhalb der Sequenzen des YB-1-Promoters vorkommen.
10. Gentransfervektor nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß die Multicloningsites (MCS) für Restriktionsenzyme sticky-RES und blunt-RES enthalten.
11. Verwendung des Vektors nach Anspruch 1-10 zur Behandlung von Tumoren.



12. Verwendung des Vektors nach Anspruch 1-10 zur Behandlung von chemoresistenten Tumoren.
  13. Verwendung des Vektors nach Anspruch 1-10 zur Behandlung von chemosensitiven Tumoren.
  14. Verwendung des Vektors nach Anspruch 1-10 zur Behandlung von Brustkrebs.
  15. Verwendung des Vektors nach Anspruch 1-10 zur Mikrolokalisation von Tumoren.
-



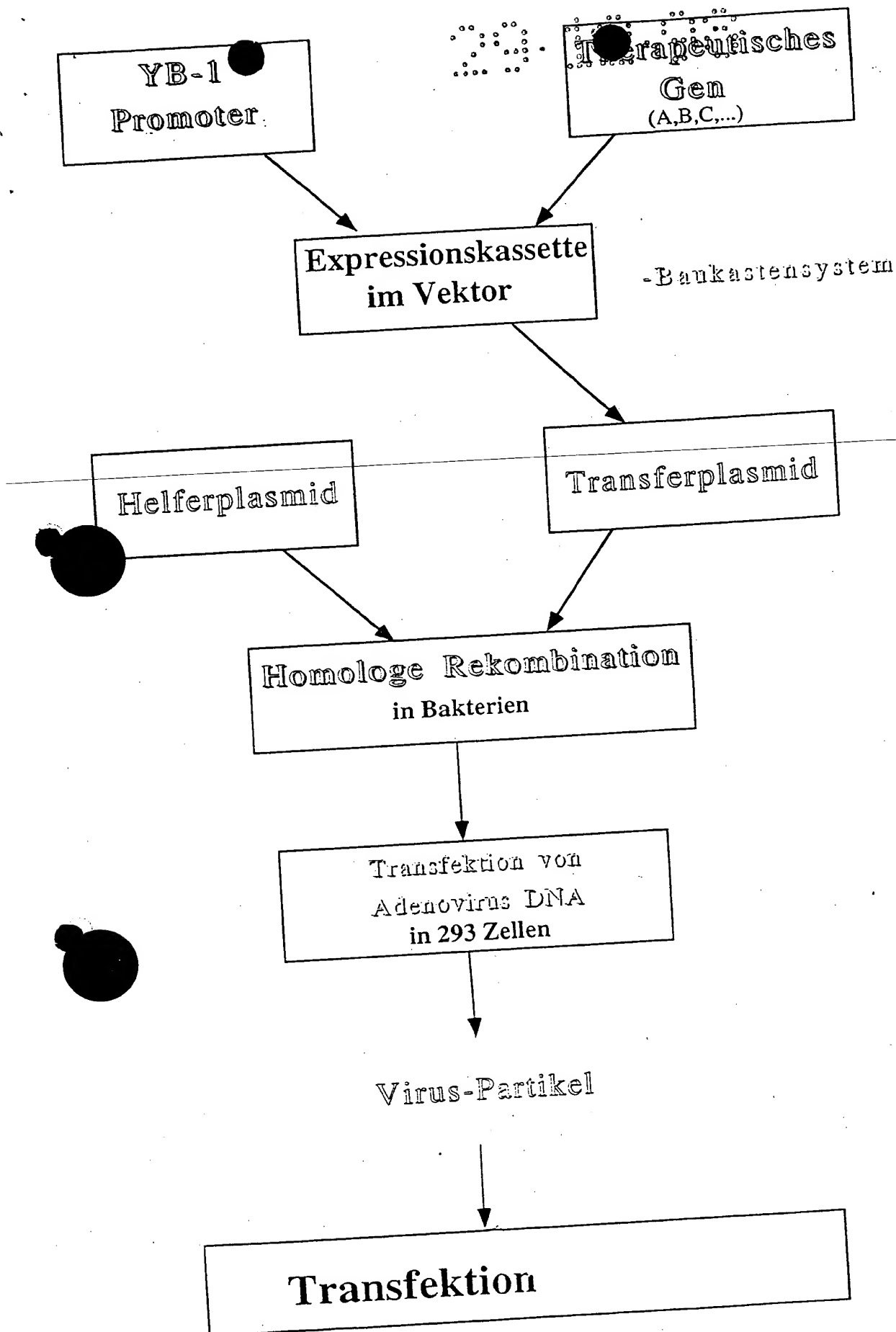
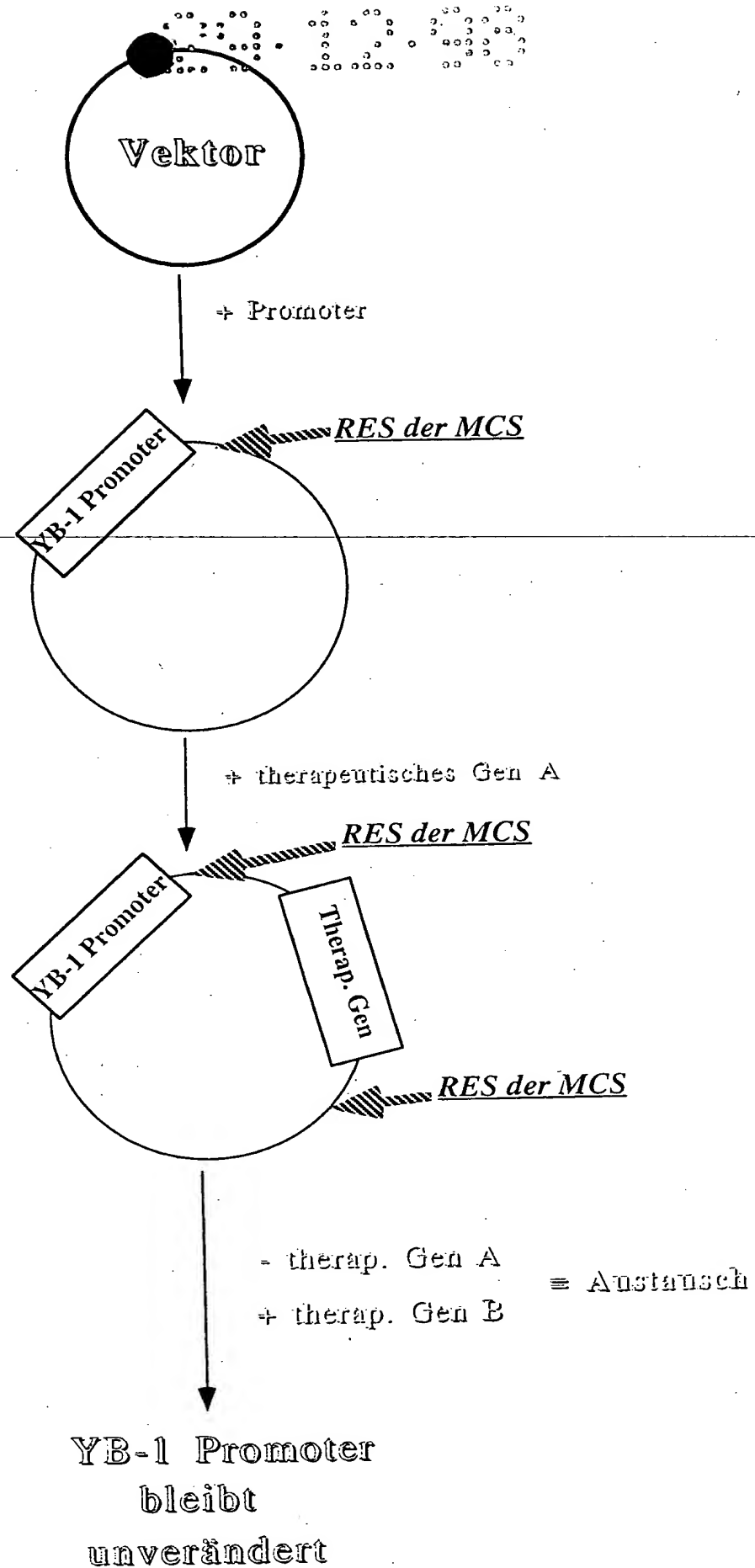


Abb. 1

Abb. 2

70



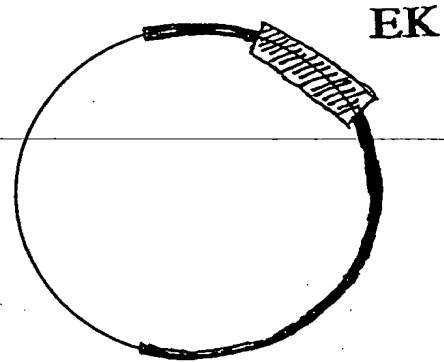
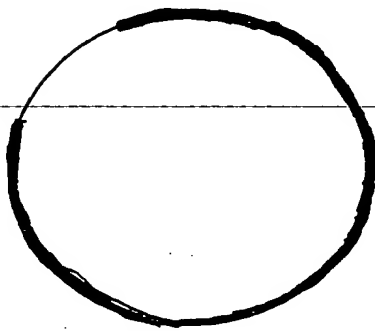
# Homologe Rekombination im Bakterium

Helferplasmid

Transferplasmid

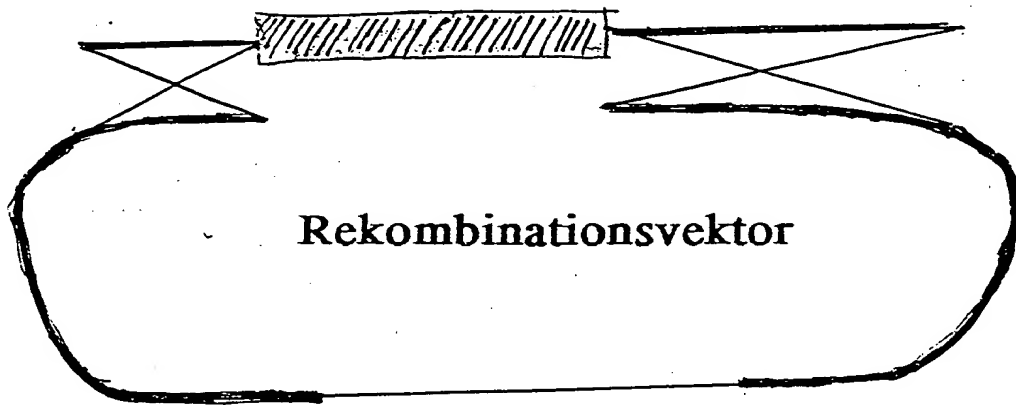
→ E1 u./o E3 deletiert

→ E1 deletiert



linearisiert

Fragment



Rekombinationsvektor



EK (Expressionskassette)



adenovirales Genom



Plasmidanteil

